植 物 分 类 与 资 源 学 报　2015，37（2）：157～167
Plant Diversity and Resources　DOI：10.7677/ynzwyj201514076

能源植物小桐子赤霉素合成代谢及信号转导相关基因的鉴定及序列分析*

高聪聪[1,2]，倪　军[1,3]，陈茂盛[1,2]，徐增富[1**]
（1 中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源可持续利用重点实验室，云南 勐腊　666303；
2 中国科学院大学，北京　100049；3 中国科学技术大学生命科学学院，合肥　230026）

摘要：赤霉素（gibberellin，GA）是一类非常重要的植物激素，在植物种子萌发、茎干伸长、叶片生长、腺毛发育、花粉成熟、开花诱导和果实成熟等生长发育过程中都发挥着重要的作用。GA 在一年生草本植物中可以促进开花，而在大多数多年生木本植物中则抑制成花诱导。为了更好地研究赤霉素在木本油料能源植物小桐子（*Jatropha curcas*）开花调控方面的作用机理，我们对小桐子整个基因组中参与 GA 合成代谢和信号转导的全部基因进行了鉴定和序列分析。这些基因包括 6 个多基因家族编码的蛋白，即 GA2 氧化酶（GA2-oxidase，GA2ox）、GA3 氧化酶（GA3-oxidase，GA3ox）、GA20 氧化酶（GA20-oxidase，GA20ox）、GID1（GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1）、DELLAs 和 F-box 蛋白，以及 2 个单基因编码的蛋白，EL1（EARLY FLOWERING1）和 SPY（SPINDLY）。采用拟南芥和水稻中已经鉴定的上述基因编码的蛋白序列在小桐子基因组序列数据库和本实验的小桐子转录组数据库中进行 BLASTP 分析，找到 17 个同源蛋白的全长序列，并将其与 28 个拟南芥的、16 个水稻的、24 个葡萄的和 22 个蓖麻的同源蛋白构建系统发育树进行比对分析。结果表明，小桐子中参与赤霉素合成代谢及信号转导的大多数基因与蓖麻和葡萄同源基因的相似度更高。

关键词：赤霉素；合成代谢；信号转导；小桐子；系统发育
中图分类号：Q 75　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：2095-0845(2015)02-157-11

Characterization of Genes Involved in Gibberellin Metabolism and Signaling Pathway in the Biofuel Plant *Jatropha curcas*

GAO Cong-cong[1,2], NI Jun[1,3], CHEN Mao-sheng[1,2], XU Zeng-fu[1**]
(1 *Laboratory of Tropical Plant Resource Science*, *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Mengla, Yunnan 666303, China; 2 *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China; 3 *School of Life Sciences*, *University of Science and Technology of China*, Hefei 230026, China)

Abstract: Gibberellins (GAs) are essential phytohormones that control many aspects of plant development, including seed germination, stem elongation, leaf growth, flowering induction, development of glandular hairs, and pollen maturation. However, there are different mechanisms underlying GA-regulated flowering in perennial woody plants and annual herb plants. To facilitate study about the role of GAs in the biofuel plant *Jatropha curcas*, we identified all genes involved in GA metabolism and signaling pathways. These genes include members of six gene families, i. e., GA2-oxidase (GA3ox), GA3-oxidase (GA3ox), GA20-oxidase (GA20ox), GA receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1), DELLA growth inhibitors (DELLAs), and F-box proteins, and two single

* 基金项目：云南省高端科技人才引进计划项目（2009CI123）；云南省应用基础研究计划重点项目（2011FA034）和中国科学院“一三五”专项（XTBG-T02）的资助
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：zfxu@xtbg.ac.cn
收稿日期：2014-05-13，2014-07-10 接受发表
作者简介：高聪聪（1989-）男，硕士研究生，主要从事能源植物分子育种研究。E-mail：gao.cong2011@gmail.com

genes SPINDLY (SPY) and EARLY FLOWERING1 (EL1). *Jatropha* homologs of genes from *Arabidopsis* and rice (*Oryza sativa*) were identified by blasting the genome and transcriptome database of *Jatropha*. Total 17 genes involved in GA metabolism and signaling pathway were identified from *Jatropha*, and were phylogenetically analyzed with homologs from *Arabidopsis*, rice, grape (*Vitis vinifera*), and castor bean (*Ricinus communis*). Our results showed that compared to *Arabidopsis* and rice, protein sequences of genes involved in GA metabolism and signaling pathways in *Jatropha* showed a higher similarity to those from castor bean and grape.

Key words: Gibberellin; Metabolism; Phytohormone signaling; *Jatropha curcas*; Phylogenetic analysis

赤霉素(gibberellins, GAs)在调控植物生长发育过程中起着非常重要的作用。它影响植株种子萌发、茎干伸长、叶片生长、腺毛发育、开花诱导、花粉成熟和果实的发育与成熟(Hauvermale 等, 2012; Peter 和 Stephen, 2012; Davière 和 Achard, 2013)。截至 2013 年,在植物和真菌中已经鉴定出 136 种不同结构的 GAs,其中只有少数 GAs 具有生物活性,主要包括 GA_1、GA_3、GA_4 和 GA_7(Giacomelli 等, 2013);而许多无活性的 GAs 是有活性 GA 的前体或者是它们钝化后的形式(Peter 和 Stephen, 2012)。

在植物中,GA_1 和 GA_4 通过两种平行的路径形成,即早期 13 羟基化和非羟基化途径(图 1)。这两种路径中参与催化形成 GA_1 和 GA_4 的关键酶都是 GA20 氧化酶(GA20-oxidase, GA20ox)和 GA3 氧化酶(GA3-oxidase, GA3ox)。另外一种双加氧酶 GA2 氧化酶(GA2-oxidase, GA2ox)则通过钝化有活性的 GA(见图 1 中虚线框)调节 GAs 在植物体内的含量(Peter 和 Stephen, 2012)。

GA 信号通路的组分主要包括 GA 受体 GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1), DELLA 蛋白家族成员(DELLAs)以及与 DELLA 蛋白降解有关的带有 F-box 基序的同源蛋白,如拟南芥中的 SLEEPY1 (SLY1)、SNEEZY (SNE) 和水稻中的 GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2 (GID2) 等(Achard 和 Genschik, 2009)。GA 的信号转导是通过介导降解 DELLA 蛋白来实现的(Harberd, 2003; Achard 和 Genschik, 2009)。在如图 2 所示的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)GA 信号转导的反应模型中,具有生物活性的 GA 与 GID1 结合,此时 GID1 构象发生改变,再与 DELLA 结合,形成 GA-GID1-DELLA 蛋白复合体,并被有 F-box 蛋白 GID2 或者 SLY1 的 $SCF^{SLY1/GID2}$ 复合物识别并结合,这时,DELLA 将被 26S 蛋白酶体识别并降解,DELLA 蛋白的降解使 GA 信号得以传递,促使下游响应 GA 信号的基因大量表达,从而调节植株生长发育(Davière 和 Achard, 2013)。SPINDLY (SPY) 是 GA 信号转导的负调

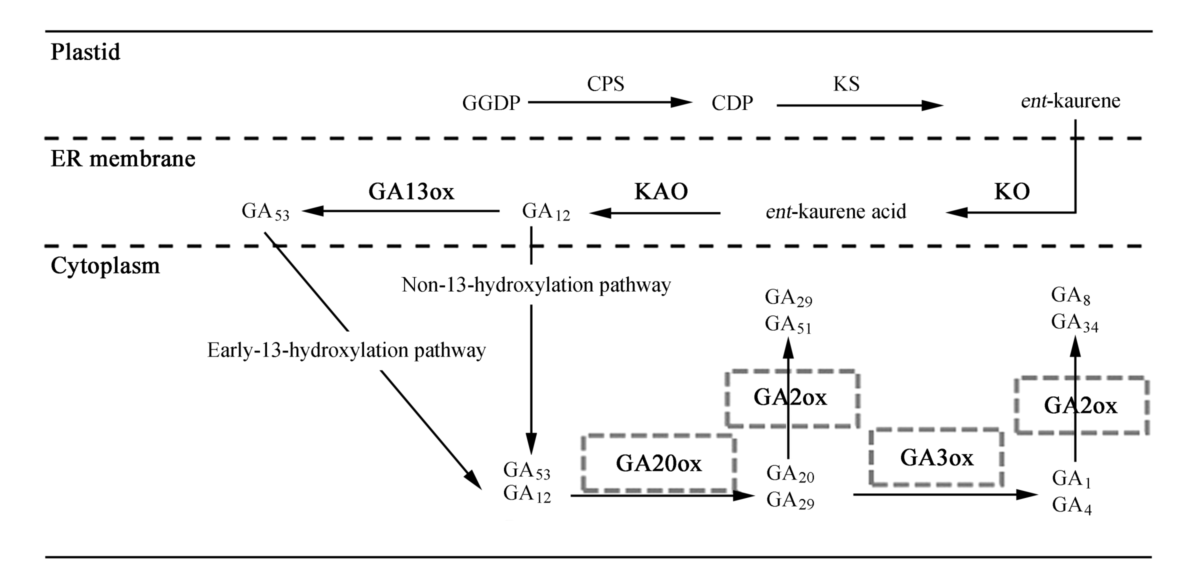


图 1 GA_1 和 GA_4 在植物中的合成与代谢示意图(Sakamoto 等, 2004; Giacomelli 等, 2013)

Fig. 1 Schematic representation of biosynthesis and metabolism of GA_1 and GA_4 in plants

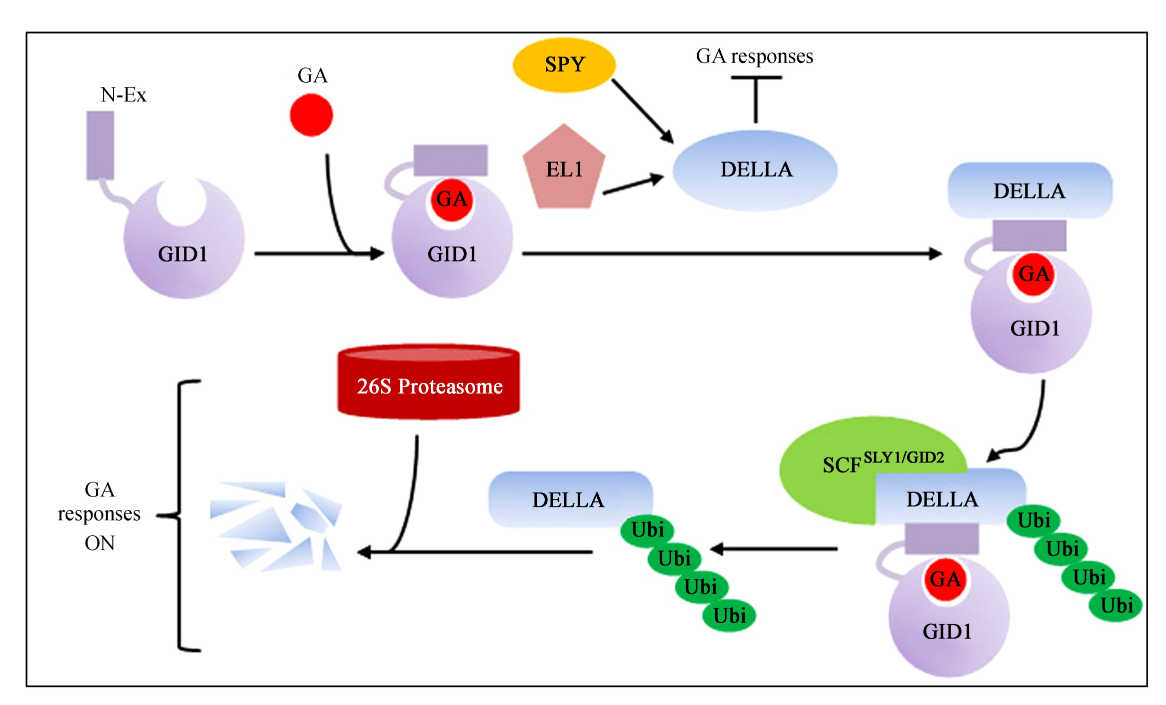


图 2　赤霉素信号转导通路（Sun，2010；Davière 和 Achard，2013）

Fig. 2　GA signaling pathway in plants

节子，它编码了一个 O-乙酰葡糖胺转移酶。据此推测该蛋白可以通过乙酰化修饰而激活 DELLA 蛋白从而抑制 GA 信号（Olszewski 等，2002；Shimada 等，2006）。另外，最近在水稻（*Oryza sativa* L.）中发现了一个 DELLA 蛋白的正调节因子：EARLY FLOWERING1（EL1），它可以直接磷酸化 DELLA 蛋白来调节其活性从而影响 GA 信号（Dai 和 Xue，2010）。

研究表明，GAs 的许多已知功能在一年生草本植物和多年生木本植物中存在差异。例如 GA 在拟南芥和毒麦（*Lolium temulentum*）中可以促进开花（Wilson 等，1992；Yamaguchi 等，2014），而在多数多年生木本植物中则抑制成花诱导（Wilkie 等，2008）。外施 GA 可以促进葡萄（*Vitis* sp.）卷须的发育，抑制花序的形成（Boss 和 Thomas，2002）。外施 GA 能直接抑制芒果（*Mangifera indica*）的花序形成（Tongumpai 等，1991），并且外施 GA 可以提高玫瑰开花抑制基因 *RoKSN* 转录本的积累并抑制开花（Randoux 等，2012）。在柑橘属植物中外施 GA 也可以通过降低开花相关基因的表达，抑制其开花；而喷施 GA 合成抑制剂多效唑（paclobutrazol，PAC）则促进开花（Winston，1992；Muñoz-Fambuena 等，2012；Goldberg-Moeller 等，2013）。基于 GA 相关的突变体研究，拟南芥和水稻等模式植物 GA 的合成与信号转导方面的机理研究已经比较深入，而对于多年生木本植物，则知之甚少。

小桐子（*Jatropha curcas* L.）属于大戟科（Euphorbiaceae）麻疯树属（*Jatropha*），是一种多年生落叶灌木或小乔木，原产于美洲热带地区（Cano-Asseleih，1986），现广泛分布于非洲、亚洲的热带和亚热带地区。小桐子种子含油率高达 40%，利用其种子油加工生产的生物燃油接近于化石燃油，被公认为是最有发展潜力的能源植物之一（Fairless，2007；Makkar 和 Becker，2009）。小桐子是二倍体植物，有 22 条染色体，基因组大小约为 416 Mb（Carvalho 等，2008）。目前，小桐子基因组（Sato 等，2011）和转录组（Costa 等，2010；Wang 等，2013）的测序结果已经公布。

为了与小桐子进行比较，我们选取了其它 4 种具有全基因组序列信息的模式植物，即一年生草本植物拟南芥和水稻，多年生木质藤本植物葡萄（*Vitis vinifera* L.），以及与小桐子同为大戟科植物的蓖麻（*Ricinus communis* L.）。拟南芥是高等植物中基因组最小的的植物之一，其二倍体（*n*=5）基因组大小约为 157 Mb（Bennett 等，2003）；

拟南芥的全基因组测序工作于2000年完成（Kaul等，2000），它是植物界第一个基因组被完整测序的物种。水稻是二倍体植物（$n=14$），基因组大小约为389 Mb，其精细图的测定于2005年完成（Matsumoto等，2005）。葡萄是一种二倍体植物（$2n=38$），基因组大小约为475 Mb，其基因组在2007年被测序完成（Jaillon等，2007）。蓖麻是一种二倍体植物（$n=10$），其基因组大小约为350 Mb，基因组草图的测序于2010年完成（Chan等，2010）。

现有研究结果表明，GAs对小桐子生殖生长方面有重要作用。对花芽喷施外源GA_3能够诱导小桐子产生两性花（皮雪静等，2013），提高小桐子的雌花数目（Makwana等，2010）。利用GAs合成抑制剂多效唑（PAC）处理小桐子，能够提高单个花序的总花数和果实数量（Ghosh等，2010，2011；宋娟等，2013）。然而，目前还没有关于小桐子GA代谢和信号转导途径相关基因研究的报道。

为了更好地研究小桐子中的GA代谢和信号转导路径，我们利用已发表的小桐子基因组（Sato等，2011；Hirakawa等，2012）和转录组序列以及我们自己获得的小桐子转录组测序数据，初步对多年生小桐子的GA合成代谢与信号转导途径相关的基因进行了鉴定和序列分析，同时与拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻4种植物的同源基因进行了比较分析。本研究中我们共鉴定分析了17个小桐子基因、24个葡萄基因、28个拟南芥基因、16个水稻基因以及22个蓖麻基因。通过构建这些基因的系统发育树，我们比较了小桐子、拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻的赤霉素代谢与信号转导相关基因的进化关系。

1 材料和方法

1.1 同源基因的获得和序列比对

从NCBI、TAIR、植物基因组数据库（http://www.phytozome.net/），小桐子基因组数据库（http://www.kazusa.or.jp/jatropha/）和本实验室的小桐子转录组数据库中下载相应GA合成代谢与信号转导相关基因的氨基酸序列，利用ClustalX程序进行比对分析。葡萄中部分基因序列来自最新的文献报道（Giacomelli等，2013）。

1.2 系统发育树构建

利用MEGA 5.0软件（http://www.megasoftware.net/），用最大似然法（maximum likelihood）构建系统发育树（Immanen等，2013），并用Bootstrap方法进行检验。

2 结果与分析

为了比较分析小桐子与拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻赤霉素合成代谢和信号路径的蛋白序列，我们分析了参与赤霉素合成代谢和信号转导过程中的8类主要基因，包括6个基因家族的编码蛋白：GA20ox、GA3ox、GA2ox、GID1、DELLAs和F-box相关蛋白；2个单基因编码的蛋白EL1和SPY（Robertson等，1998；Shimada等，2006；Zentella等，2007；Dai和Xue，2010；Hauvermale等，2012；Davière和Achard，2013）（表1）。利用拟南芥和水稻中已经鉴定的上述基因蛋白序列在小桐子数据库中进行比对，找到其同源基因的蛋白序列，然后利用构建系统发育树对这8类主要基因的蛋白序列同源性进行对比分析。

2.1 GA合成酶GA20ox

GA20ox催化合成具有生物活性的赤霉素的倒数第二步（图1），它由一个小基因家族编码，不同物种里有共有的保守基序（motif），如与2-酮戊二酸结合有关的保守序列NYYPXCQKP、H和D残基、与GA底物结合有关的LPWKET基元等（Xu等，1995）。通过蛋白序列同源比对，我们从小桐子基因组文库中找到3个GA20ox成员，分别将其命名为*JcGA20ox1*、*JcGA20ox3A*和*JcGA20ox3B*，它们与拟南芥的同源基因蛋白序列相似性分别达到63%、65%和56%。分析发现，GA20ox基因家族在葡萄和蓖麻基因组中各有6个成员，在水稻和拟南芥基因组中分别有4个和5个成员（表1）。系统进化树显示，这4个物种中各成员都比较保守（图3）。

2.2 GA合成酶GA3ox

GA3ox是催化合成GA_1和GA_4的最后一步（图1），由一个小基因家族所编码（Williams等，1998；Mitchum等，2006）。GA3ox在不同物种中保守性较低，但都含有几个重要的基序，如Met-Trp-X-Glu-Gly-Phe-Thr序列，与离子结合的组氨酸和天冬氨酸残基，以及与2-酮戊二酸的结合区。通过蛋白同源比对，我们从小桐子基因组文库中找到了2个成员，根据与拟南芥的同源基因相似度分别命名为*JcGA3ox1*和*JcGA3ox2*，

表 1　小桐子、拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻的 GA 合成代谢与信号传导相关基因的 cDNA

（括号中显示的是各个 cDNA 序列的 GenBank acc. no. 或其在小桐子基因组数据库中的编号）

物种 Species	GA 合成		GA 钝化	GA 信号传导				
	GA20ox	GA3ox	GA2ox	GA receptors	F-Box proteins	DELLA proteins	SPINDLY	Early Flowering 1
小桐子	*JcGA20ox1* (Jcr4S06166. 30)	*JcGA3ox1* (Jcr4S00062. 140)	*JcGA2ox2* (Jcr4S22350. 10)	*JcGID1A* (Jcr4S00235. 70)	*JcSLY1* (Jcr4S01146. 60)	*JcGAI* (Jcr4S02992. 40)	*JcSPY* (Jcr4S03748. 110)	*JcEL1* (Jcr4S00653. 30)
	JcGA20ox3A (Jcr4S02347. 70)	*JcGA3ox2* (Jcr4S03817. 70)	*JcGA2ox4* (Jcr4S09438. 20)	*JcGID1B* (Jcr4S06840. 20)		*JcRGA* (Jcr4S04680. 20)		
	JcGA20ox3B (Jcr4S03339. 20)		*JcGA2ox6* (Jcr4S00680. 60)					
			JcGA2ox7 (Jcr4S05418. 10)					
			JcGA2ox8 (Jcr4S01100. 30)					
拟南芥	*AtGA20ox1* (NP_194272. 1)	*AtGA3ox1* (NP_173008. 1)	*AtGA2ox1* (NP_177965. 1)	*AtGID1A* (NP_187163. 1)	*AtSLY1* (NP_194152. 1)	*AtGAI* (NP_172945. 1)	*AtSPY* (NP_187761. 1)	*AtEL1* (NP_187887. 3)
	AtGA20ox2 (NP_199994. 1)	*AtGA3ox2* (NP_178150. 1)	*AtGA2ox2* (NP_174296. 1)	*AtGID1B* (NP_191860. 1)	*AtSNE* (NP_199628. 1)	*AtRGA* (NP_178266. 1)		
	AtGA20ox3 (NP_196337. 1)	*AtGA3ox3* (NP_193900. 1)	*AtGA2ox3* (NP_181002. 1)	*AtGID1C* (NP_198084. 1)		*AtRGL1* (NP_176809. 1)		
	AtGA20ox4 (NP_176294. 1)	*AtGA3ox4* (NP_178149. 1)	*AtGA2ox4* (NP_175233. 1)			*AtRGL2* (NP_186995. 1)		
	AtGA20ox5 (NP_175075. 1)		*AtGA2ox6* (NP_171742. 1)			*AtRGL3* (NP_197251. 1)		
			AtGA2ox7 (NP_175509. 1)					
			AtGA2ox8 (NC_003075. 7)					
水稻	*OsGA20ox1* (AC096690)	*OsGA3ox1* (AC144738. 1)	*OsGA2ox* (XP_475621)	*OsGID1* (AB211399.1)	*OsGID2* (AB100246)	*OsSLR1* (AB262980)	*OsSPY* (BAD13137)	*OsEL1* (BAD07677)
	OsGA20ox2 (AP003561)	*OsGA3ox2* (AP002523. 1)	*OsGA2ox2* (NP_001042364)					

续表 1 Table continued

物种 Species	GA 合成		GA 钝化	GA 信号传导				
	GA20ox	GA3ox	GA2ox	GA receptors	F-Box proteins	DELLA proteins	SPINDLY	Early Flowering 1
水稻	*OsGA20ox3* (AP005840)		*OsGA2ox3* (NP_001044292)					
	OsGA20ox4 (AC124836)		*OsGA2ox4* (AC132485)					
葡萄	*VvGA20ox1* (KC898188. 1)	*VvGA3ox1* (KC898176. 1)	*VvGA2ox1* (KC898179. 1)	*VvGID1A* (AFG17072.1)	*VvGID2-like1* (XP_003632510. 1)	*VvGAI* (HQ834311. 1)	*VvSPY* (XP_002281883. 1)	*VvEL1* (CBI30029. 3)
	VvGA20ox2 (KC898186. 1)	*VvGA3ox2* (KC89817. 1)	*VvGA2ox2* (KC898180. 1)	*VvGID1B* (XP_002271700. 1)	*VvGID2-like2* (XP_002285053. 2)	*VvRGA* (XP_002266267. 1)		
	VvGA20ox3 (KC898189. 1)	*VvGA3ox3* (KC898177. 1)	*VvGA2ox3* (KC898181. 1)					
	VvGA20ox4 (no mRNA detected)		*VvGA2ox4* (KC898182. 1)					
	VvGA20ox5 (no mRNA detected)		*VvGA2ox5* (KC898183. 1)					
	VvGA20ox6 (no mRNA detected)		*VvGA2ox6* (KC898185. 1)					
			VvGA2ox7 (KC898184. 1)					
			VvGA2ox8 (no mRNA detected)					
蓖麻	*RcGA20ox1* (XP_002511762. 1)	*RcGA3ox1* (XP_002517539. 1)	*RcGA2ox2* (XP_002519685. 1)	*RcGID1A* (XP_002512310. 1)	*RcGID2* (XP_002510145. 1)	*RcGAI* (XP_002534030. 1)	*RcSPY* (XP_002530535. 1)	*RcEL1* (XP_002523405. 1)
	RcGA20ox2A (XP_002527163. 1)	*RcGA3ox2* (XP_002515599. 1)	*RcGA2ox4* (XP_002519276. 1)	*RcGID1B* (XP_002524767. 1)	*RcSNE* (XP_002530225. 1)	*RcGAI1* (XP_002534030. 1)		
	RcGA20ox2B (XP_002527606. 1)	*RcGA3ox3A* (XP_002515559. 1)	*RcGA2ox5* (XP_002515236. 1)			*RcGAIP-B* (XP_002527794. 1)		
	RcGA20ox3 (XP_002510873. 1)	*RcGA3ox3B* (XP_002514367. 1)						
	RcGA20ox5 (XP_002532351. 1)							
	RcGA20ox6 (XP_002520280. 1)							

它们与拟南芥的同源基因相似度分别为 62% 和 44%。该基因家族在葡萄基因组中有 3 个成员，在水稻中有 2 个，在拟南芥和蓖麻中都有 4 个成员（表 1）。如图 4 所示的系统发育树显示，小桐子与蓖麻和葡萄的基因更加近缘。

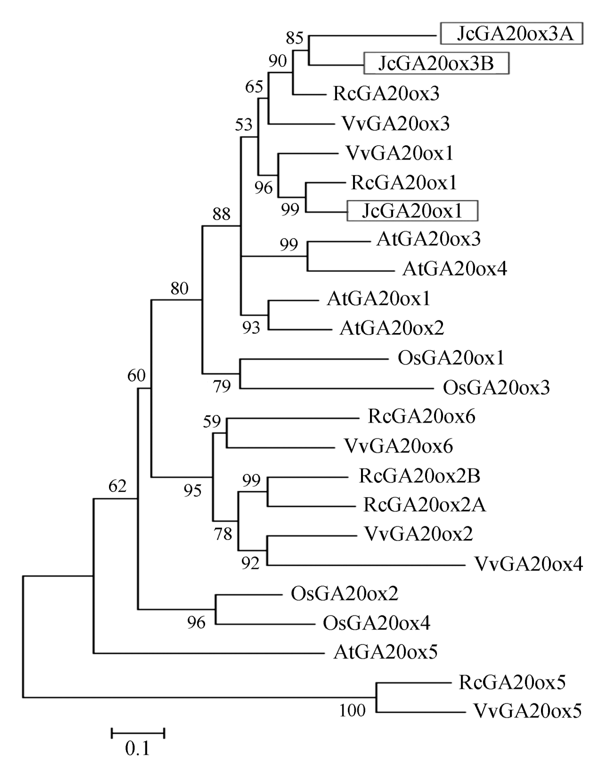


图 3　小桐子、拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻 GA20ox 蛋白序列系统进化树

Fig. 3　Phylogenetic analysis of the GA20ox family members in *Jatropha curcas* (*Jc*), *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Oryza sativa* (*Os*), *Vitis vinifera* (*Vv*), and *Ricinus communis* (*Rc*)

2.3　GA 降解酶 GA2ox

GA2ox 是 GA 降解代谢的关键酶，也是由小基因家族编码的，通过对体内具有生物活性的 GAs 及其前体和其他中间产物进行分解失活（图 1），从而维持植物体内具有生物活性的 GAs 和中间体之间的平衡（Thomas 等，1999）。通过蛋白同源比对，我们从小桐子基因组文库中找到了 5 个 GA2ox 成员，与拟南芥的同源基因相似度分别达到 67%、60%、60%、47% 和 58%，分别命名为 *JcGA2ox2*、*JcGA2ox4*、*JcGA2ox6*、*JcGA2ox7* 和 *JcGA2ox8*。GA2ox 基因家族在水稻基因组中有 4 个成员，拟南芥基因组中有 7 个成员，葡萄基因组有 8 个成员，蓖麻基因组中只有 3 个成员（表 1）。GA2ox 蛋白系统发育树如图 5 所示。

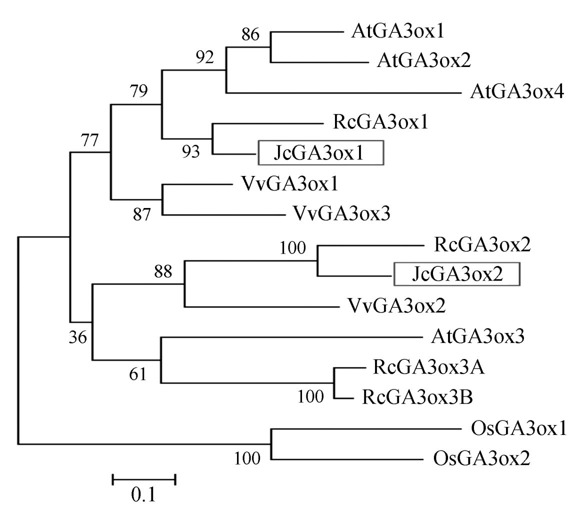


图 4　小桐子、拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻的 GA3ox 蛋白序列系统进化树

Fig. 4　Phylogenetic analysis of the GA3ox family members in *Jatropha curcas* (*Jc*), *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Oryza sativa* (*Os*), *Vitis vinifera* (*Vv*), and *Ricinus communis* (*Rc*)

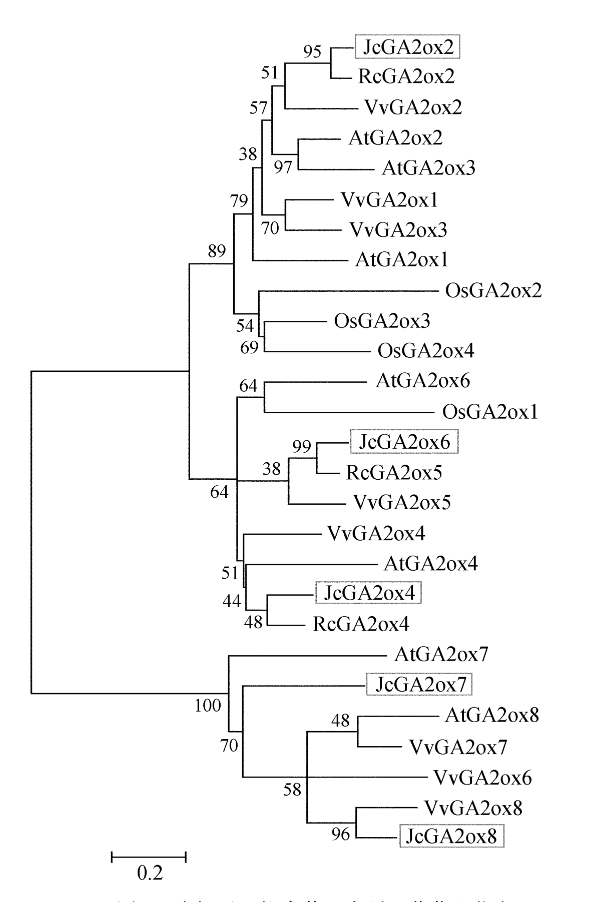


图 5　小桐子、拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻 GA2ox 蛋白序列系统进化树

Fig. 5　Phylogenetic analysis of the GA2ox family members in *Jatropha curcas* (*Jc*), *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Oryza sativa* (*Os*), *Vitis vinifera* (*Vv*), and *Ricinus communis* (*Rc*)

2.4 GA 受体 GID1

GID1 是一种可溶性的核定位的赤霉素受体（Tyler 等，2004；Ueguchi-Tanaka 等，2005），具有保守的 HSL 框 HCG 和 GXSXG（Østerlund，2001）。晶体结构显示，GID1 包含一个赤霉素结合口袋和一个自由伸缩的延长的 N-端（N-Ex，见图 2）（Shimada 等，2008）。当有生物活性的 GA 结合到 GID1 上后，使得 GID1 构象发生变化，延长的 N-端将口袋闭合，然后与 DELLA 蛋白的两个区域 DELLA/VHYNP 相互作用，形成 GA-GID1-DELLA 复合体（Willige 等，2007）。水稻基因组中只有 1 个 *GID1* 基因，拟南芥基因组中则有 3 个功能重叠的同源物（*AtGID1*，*AtGID1B* 和 *AtGID1C*）（Nakajima 等，2006）。葡萄和蓖麻基因组中都有 2 个同源基因（*VvGID1A*，*VvGID1B*，*RcGID1A* 和 *RcGID1B*）。利用拟南芥 GID1 蛋白序列，通过蛋白同源比对，我们从小桐子基因组文库中找到了 2 个成员，将其分别命名为 *JcGID1A* 和 *JcGID1B*。它们与拟南芥的同源蛋白相似度分别达到 84%和 80%。GID1 蛋白系统发育树如图 6 所示。

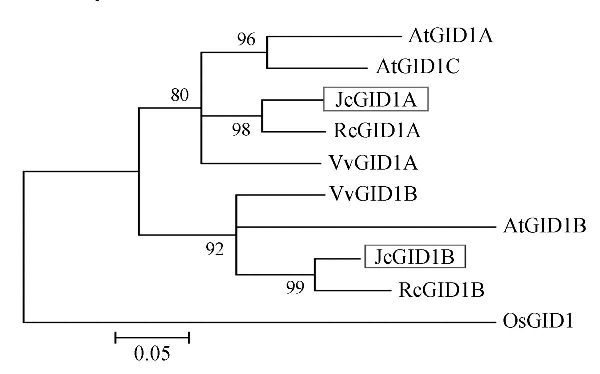


图 6 小桐子、拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻 GID1 蛋白序列系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic analysis of the GID1 family members in *Jatropha curcas* (*Jc*), *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Oryza sativa* (*Os*), *Vitis vinifera* (*Vv*), and *Ricinus communis* (*Rc*)

2.5 GA 信号转导的负调控因子 DELLA 蛋白

DELLA 蛋白是植物特异性的转录调节子 GRAS 家族的亚单位，是植物细胞内 GA 信号最重要的抑制因子（Zentella 等，2007；Achard 和 Genschik，2009；Sun，2010）。DELLA 蛋白的 C-端含有一个参与转录调节的 GRAS 结构域，包括 2 个重复亮氨酸基序（LHRI 和 LHRII）和 3 个保守的 VHIID、PFYRE 和 SAW 基序（Bolle，2004）。与其他 GRAS 家族不同的是，DELLA 蛋白的 N-端含有 2 个保守的结构域：由天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸，亮氨酸和丙氨酸构成的“DELLA 区域”和 TVHYNP 结构域（Hauvermale 等，2012），如图 7 所示。DELLA 蛋白在不同的植物中高度保守。拟南芥基因组中有 5 个 DELLA 蛋白（GA-INSENSITIVE，GAI；REPRESSOR OF GA1-3，RGA；RGA-LIKE 1，RGL1；RGA-LIKE 2，RGL2；RGA-LIKE 3，RGL3）（Tyler 等，2004）。水稻只有 1 个：SLR1，葡萄中有 2 个：RGA 和 GAI，蓖麻有 3 个：GAI、GAI1 和 GAP-B。通过蛋白同源比较，我们从小桐子基因组文库中找到了 2 个成员，根据与拟南芥 DELLA 蛋白成员的相似度高低，我们将其分别命名为 JcGAI 和 JcRGA。它们与拟南芥的同源蛋白相似度分别达到 60%和 69%。系统发育树如图 7 所示。

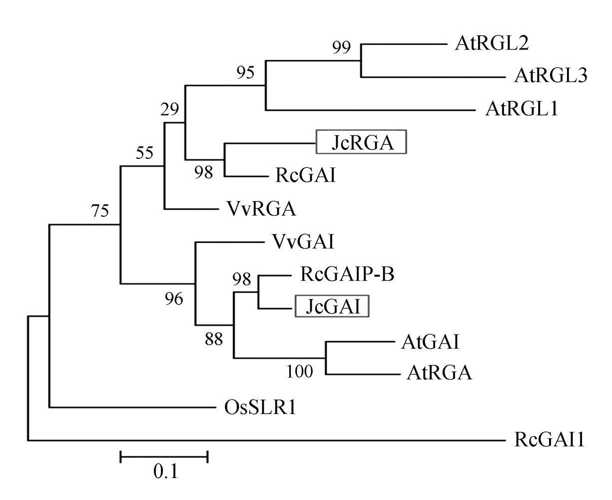


图 7 小桐子、拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻 DELLAs 蛋白氨基酸序列系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic analysis of the DELLA family members in *Jatropha curcas* (*Jc*), *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Oryza sativa* (*Os*), *Vitis vinifera* (*Vv*), and *Ricinus communis* (*Rc*)

2.6 GA 信号转导的正调控因子 F-box 蛋白

F-box 蛋白是 E3 泛素连接酶 SCF 复合体的一个亚基，它决定了底物识别的特异性（Zentella 等，2007）。当形成 GA-GID1-DELLA 复合体时，SCF 就能结合到 GRAS 区域上，一旦被 SCF 结合，DELLA 将被 26S 复合体识别并降解 DELLA 蛋白使 GA 早期反应基因得以表达。水稻中编码该类型 F-box 蛋白的基因被叫做 *GID2*，拟南芥

基因组中有 2 个同源物（*AtSLY1* 和 *AtSLY2*），葡萄中有 3 个同源蛋白（GID2-like1、GID2-like2 和 SNE-like），蓖麻基因组中有 2 个同源基因（*GID2* 和 *SNE*）。通过蛋白比对，我们从小桐子基因组文库中找到了 1 个成员，它与拟南芥 AtSLY1 的相似度为 57%，我们将其命名为 JcSLY1。F-box 蛋白系统发育树如图 8 所示。

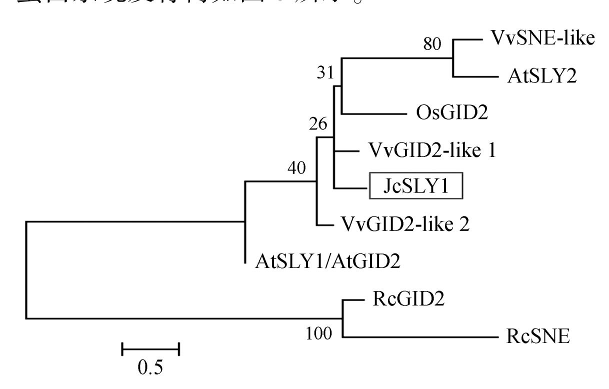


图 8　小桐子、拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻 F-box 蛋白系统进化树

Fig. 8　Phylogenetic analysis of the F-box protein family members in *Jatropha curcas*（*Jc*）, *Arabidopsis thaliana*（*At*）, *Oryza sativa*（*Os*）, *Vitis vinifera*（*Vv*）, and *Ricinus communis*（*Rc*）

2.7　GA 信号转导的负调控因子 SPINDLY

拟南芥和水稻中的 *SPLNDLY*（*SPY*）编码了 1 个 O-乙酰葡萄糖胺转移酶，可以对 DELLA 蛋白进行 N-乙酰氨基葡萄糖胺修饰，从而激活 DELLA 蛋白，是一种 GA 信号转导的负调控因子（Swain 等，2001）。我们利用拟南芥 AtSPY 氨基酸序列进行同源比对，从小桐子基因组文库中找到了其同源蛋白（*JcSPY*），它们之间的相似度达到 81%。在水稻、葡萄和蓖麻基因组中也分别发现了其同源基因（*OsSPY*，*VvSPY*1 和 *RcSPY*）。SPY 蛋白系统发育树如图 9 所示。

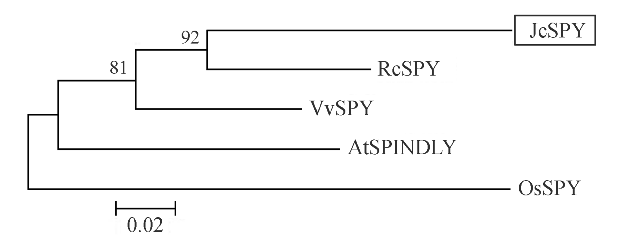


图 9　小桐子、水稻、葡萄、拟南芥和蓖麻 SPY 蛋白序列系统进化树

Fig. 9　Phylogenetic analysis of the SPY protein family members in *Jatropha curcas*（*Jc*）, *Arabidopsis thaliana*（*At*）, *Oryza sativa*（*Os*）, *Vitis vinifera*（*Vv*）, and *Ricinus communis*（*Rc*）

2.8　GA 信号转导的负调控因子 EARLY FLOWERING 1

近年来研究发现，水稻中 *EARLY FLOWERING11*（*EL1*）基因编码的一种 DELLA 蛋白的正调节因子丝氨酸/苏氨酸蛋白酪蛋白激酶 1，通过对 DELLA SLR1 进行磷酸化可以调节其活性（Dai 和 Xue，2010）。通过蛋白同源比对，利用拟南芥 AtEL1 蛋白序列我们从小桐子基因组文库中找到了同源蛋白（JcEL1），相似度为 59%，在水稻、葡萄和蓖麻基因组中也分别发现了其同源基因（*OsEL1*、*VvEL1* 和 *RcEL1*）。EL1 蛋白系统发育树如图 10 所示。

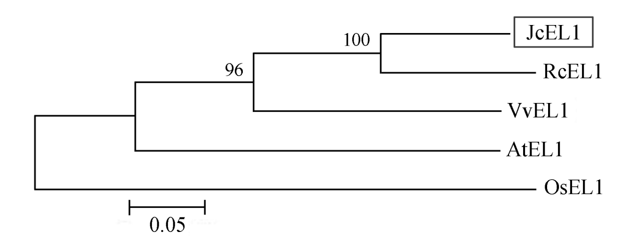


图 10　小桐子、拟南芥、水稻、葡萄和蓖麻 EL1 蛋白序列系统进化树

Fig. 10　Phylogenetic analysis of the EL1 protein family members in *Jatropha curcas*（*Jc*）, *Arabidopsis thaliana*（*At*）, *Oryza sativa*（*Os*）, *Vitis vinifera*（*Vv*）, and *Ricinus communis*（*Rc*）

3　讨论

已有的研究结果显示，GAs 在小桐子的生殖生长方面起着重要作用（Ghosh 等，2010；Makwana 等，2010；Ghosh 等，2011；皮雪静等，2013；宋娟等，2013），但是在小桐子中，有关赤霉素合成代谢和信号转导的相关基因研究还未见报道。我们对小桐子中参与 GA 合成代谢和信号转导的 8 类主要基因进行了系统的鉴定，并与两种模式植物拟南芥和水稻，以及两种多年生植物葡萄和蓖麻中的同源基因蛋白序列进行了比对分析。结果表明，在小桐子中，参与 GA 代谢与信号转导的基因成员数量比拟南芥、葡萄和蓖麻少，但比水稻多。系统发育分析表明，小桐子的大多数 GA 合成代谢和信号转导基因与蓖麻和葡萄的同源基因相似性更高。

赤霉素信号转导模式的建立主要是通过拟南芥和水稻等模式植物中有关 GAI/RGA 蛋白的研究及其与上下游作用因子蛋白的相互作用获得的。拟南芥 DELLA 蛋白有 5 个成员，GAI 和 RGA

抑制植物的营养生长与开花诱导（Dill 和 Sun，2001），RGL1 和 RGL2 则分别在控制花芽分化和花发育过程中发挥着重要作用（Cheng 等，2004；Tyler 等，2004），而 RGL3 参与拟南芥对胁迫的反应（Wild 等，2012）。最近，Yamaguchi 等（2014）研究发现 GA 促进拟南芥从营养生长向生殖生长的转变，但抑制花的形成。这些由模式植物所建立起来的作用模型，为研究包括小桐子在内的多年生木本植物中 DELLA 蛋白各成员在生长发育调控方面的作用提供了重要基础。本研究中我们在小桐子基因组数据库中鉴定到与水稻 *EL1* 同源的基因 *JcEL1*，水稻失去 *EL1* 功能的突变体表现出 GA 的高度敏感性并导致了提前开花（Cano-Asseleih，1986；Hauvermale 等，2012）。EL1 类蛋白作为 GA 信号转导的负调控因子对多年生的小桐子开花调控可能也具有重要的作用。本研究所鉴定的参与小桐子 GA 合成代谢与信号转导途径相关的 8 类 17 个基因为进一步研究 GA 调控小桐子开花的作用机理奠定基础。

〔参 考 文 献〕

Achard P, Genschik P, 2009. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins [J]. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 1085—1092

Bennett MD, Leitch IJ, Price HJ *et al.*, 2003. Comparisons with Caenorhabditis (~100 Mb) and Drosophila (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in Arabidopsis to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the Arabidopsis Genome Initiative estimate of ~125 Mb [J]. *Annals of Botany*, **91**: 547—557

Bolle C, 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development [J]. *Planta*, **218**: 683—692

Boss PK, Thomas MR, 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation [J]. *Nature*, **416**: 847—850

Cano-Asseleih LM, 1986. Chemical investigation of *Jatropha curcas* L. seeds (Ph. D. Thesis) [D]. London: University of London, UK

Carvalho CR, Clarindo WR, Praça MM *et al.*, 2008. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant [J]. *Plant Science*, **174**: 613—617

Chan AP, Crabtree J, Zhao Q *et al.*, 2010. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis* [J]. *Nature Biotechnology*, **28**: 951—956

Cheng H, Qin L, Lee S *et al.*, 2004. Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function [J]. *Development*, **131**: 1055—1064

Costa GGL, Cardoso KC, Del Bem LEV *et al.*, 2010. Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. [J]. *BMC Genomics*, **11**: 462

Dai C, Xue HW, 2010. Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling [J]. *EMBO Journal*, **29**: 1916—1927

Davière JM, Achard P, 2013. Gibberellin signaling in plants [J]. *Development*, **140**: 1147—1151

Dill A, Sun TP, 2001. Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, **159**: 777—785

Fairless D, 2007. Biofuel: the little shrub that could-maybe [J]. *Nature*, **449**: 652—655

Ghosh A, Chikara J, Chaudhary DR, 2011. Diminution of economic yield as affected by pruning and chemical manipulation of *Jatropha curcas* L. [J]. *Biomass and Bioenergy*, **35**: 1021—1029

Ghosh A, Chikara J, Chaudhary DR *et al.*, 2010. Paclobutrazol arrests vegetative growth and unveils unexpressed yield potential of *Jatropha curcas* [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, **29**: 307—315

Giacomelli L, Rota-Stabelli O, Masuero D *et al.*, 2013. Gibberellin metabolism in *Vitis vinifera* L. during bloom and fruit-set: functional characterization and evolution of grapevine gibberellin oxidases [J]. *Journal of Experimental Botany*, **64**: 4403—4419

Goldberg-Moeller R, Shalom L, Shlizerman L *et al.*, 2013. Effects of gibberellin treatment during flowering induction period on global gene expression and the transcription of flowering-control genes in *Citrus* buds [J]. *Plant Science*, **198**: 46—57

Harberd NP, 2003. Relieving DELLA restraint [J]. *Science*, **299**: 1853—1854

Hauvermale AL, Ariizumi T, Steber CM, 2012. Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression [J]. *Plant Physiology*, **160**: 83—92

Hirakawa H, Tsuchimoto S, Sakai H *et al.*, 2012. Upgraded genomic information of *Jatropha curcas* L. [J]. *Plant Biotechnology*, **29**: 123—130

Immanen J, Nieminen K, Duchens Silva H *et al.*, 2013. Characterization of cytokinin signaling and homeostasis gene families in two hardwood tree species: *Populus trichocarpa* and *Prunus persica* [J]. *BMC Genomics*, **14**: 885

Jaillon O, Aury JM, Noel B *et al.*, 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla [J]. *Nature*, **449**: 463—467

Kaul S, Koo HL, Jenkins J *et al.*, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, **408**: 796—815

Makkar HP, Becker K, 2009. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111**: 773—787

Makwana V, Shukla P, Robin P, 2010. GA application induces alteration in sex ratio and cell death in *Jatropha curcas* [J]. *Plant Growth Regulation*, **61**: 121—125

Matsumoto T, Wu JZ, Kanamori H *et al.*, 2005. The map-based sequence of the rice genome［J］. *Nature*, **436**: 793—800

Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A *et al.*, 2006. Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development［J］. *Plant Journal*, **45**: 804—818

Muñoz-Fambuena N, Mesejo C, Gonzúlez-Mas MC *et al.*, 2012. Gibberellic acid reduces flowering intensity in sweet orange［*Citrus sinensis*（L.）Osbeck］by repressing CiFT gene expression［J］. *Journal of Plant Growth Regulation*, **31**: 529—536

Nakajima M, Shimada A, Takashi Y *et al.*, 2006. Identification and characterization of *Arabidopsis gibberellin* receptors［J］. *The Plant Journal*, **46**（5）: 880—889

Olszewski N, Sun TP, Gubler F, 2002. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways［J］. *Plant Cell*, **14**: S61—S80

Pi XJ（皮雪静）, Pan BZ（潘帮珍）, Xu ZF（徐增富）, 2013. Induction of bisexual flowers by gibberellin in monoecious biofuel plant *Jatropha curcas*（Euphorbiaceae）［J］. *Plant Diversity and Resources*（植物分类与资源学报）, **35**（1）: 26—32

Østerlund T, 2001. Structure-function relationships of hormone-sensitive lipase［J］. *European Journal of Biochemistry*, **268**: 1899—1907

Peter H, Stephen GT, 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation［J］. *Biochemical Journal*, **444**: 11—25

Randoux M, Jeauffre J, Thouroude T *et al.*, 2012. Gibberellins regulate the transcription of the continuous flowering regulator, *RoKSN*, a rose *TFL1* homologue［J］. *Journal of Experimental Botany*, **63**: 6543—6554

Robertson M, Swain SM, Chandler PM *et al.*, 1998. Identification of a negative regulator of gibberellin action, HvSPY, in barley［J］. *Plant Cell*, **10**: 995—1007

Sakamoto T, Miura K, Itoh H *et al.*, 2004. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice［J］. *Plant Physiology*, **134**: 1642—1653

Sato S, Hirakawa H, Isobe S *et al.*, 2011. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L.［J］. *DNA Research*, **18**: 65—76

Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T *et al.*, 2008. Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1［J］. *Nature*, **456**: 520—523

Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Sakamoto T *et al.*, 2006. The rice SPINDLY gene functions as a negative regulator of gibberellin signaling by controlling the suppressive function of the DELLA protein, SLR1, and modulating brassinosteroid synthesis［J］. *Plant Journal*, **48**: 390—402

Song J（宋娟）, Chen MS（陈茂盛）, Li JL（李家龙）*et al.*, 2013. Effects of soil-applied paclobutrazol on the vegetative and reproductive growth of biofuel plant *Jatropha curcas*［J］. *Plant Diversity and Resources*（植物分类与资源学报）, **35**（2）: 173—179

Sun TP, 2010. Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development［J］. *Plant Physiology*, **154**: 567—570

Swain SM, Tseng TS, Olszewski NE, 2001. Altered expression of SPINDLY affects gibberellin response and plant development［J］. *Plant Physiology*, **126**: 1174—1185

Thomas SG, Phillips AL, Hedden P, 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation［J］. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**: 4698—4703

Tongumpai P, Jutamanee K, Sethapakdi R *et al.*, 1991. Variation in level of gibberellin-like substances, during vegetative growth and flowering of mango cv. Khiew Sawoey. ISHS Acta Horticulturae 291（III International Mango Symposium）, 291

Tyler L, Thomas SG, Hu J *et al.*, 2004. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis［J］. *Plant Physiology*, **135**: 1008—1019

Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M *et al.*, 2005. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin［J］. *Nature*, **437**: 693—698

Wang H, Zou Z, Wang S *et al.*, 2013. Global analysis of transcriptome responses and gene expression profiles to cold stress of *Jatropha curcas* L［J］. *PLoS ONE*, **8**: e82817

Wild M, Daviere JM, Cheminant S *et al.*, 2012. The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses［J］. *Plant Cell*, **24**: 3307—3319

Wilkie JD, Sedgley M, Olesen T, 2008. Regulation of floral initiation in horticultural trees［J］. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 3215—3228

Williams J, Phillips AL, Gaskin P *et al.*, 1998. Function and substrate specificity of the gibberellin 3 beta-hydroxylase encoded by the *Arabidopsis* GA4 gene［J］. *Plant Physiology*, **117**: 559—563

Willige BC, Ghosh S, Nill C *et al.*, 2007. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis［J］. *Plant Cell*, **19**: 1209—1220

Wilson RN, Heckman JW, Somerville CR, 1992. Gibberellin is required for flowering in Arabidopsis thaliana under short days［J］. *Plant Physiology*, **100**: 403—408

Winston E, 1992. Evaluation of paclobutrazol on growth, flowering and yield of mango cv. Kensington Pride［J］. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **32**: 97—104

Xu YL, Li L, Wu KQ *et al.*, 1995. The Ga5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase-molecular cloning and functional expression［J］. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**: 6640—6644

Yamaguchi N, Winter CM, Wu MF *et al.*, 2014. Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in *Arabidopsis*［J］. *Science*, **344**: 638—641

Zentella R, Zhang ZL, Park M *et al.*, 2007. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis［J］. *Plant Cell*, **19**: 3037—3057